

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker payudara merupakan tumor ganas yang menyerang jaringan payudara (Mardiana, 2004). Kanker payudara dapat terjadi pada pria maupun wanita, hanya saja prevalensi pada wanita jauh lebih tinggi. Diperkirakan pada tahun 2006 di Amerika, terdapat 212.920 kasus baru kanker payudara pada wanita dan 1.720 kasus baru pada pria, dengan 40.970 kasus kematian pada wanita dan 460 kasus kematian pada pria. Di Indonesia, kanker payudara menempati urutan ke dua setelah kanker leher rahim. Kejadian kanker payudara di Indonesia sebesar 11 % dari seluruh kejadian kanker (Anonim, 2005).

Penatalaksanaan kanker payudara dilakukan dengan serangkaian pengobatan meliputi pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi radiasi dan yang terbaru adalah terapi imunologi (antibodi) (Nurlaila, 2011). Penanganan dengan operasi, radiasi dan kemoterapi belum memperoleh hasil yang optimal dan efek saat pengobatan ataupun pasca pengobatan dirasakan masih merugikan dan mengganggu pasien. Efek yang muncul antara lain tubuh menjadi lemah, nafsu makan berkurang, warna kulit di sekitar payudara menjadi hitam, serta Hb dan leukosit cenderung menurun (radiasi), mual dan muntah serta rambut rontok (kemoterapi) (Nurlaila, 2011). Obat antikanker yang ideal seharusnya cepat membunuh sel kanker tanpa membahayakan jaringan normal. Sampai sekarang belum ditemukan obat-obatan yang memenuhi kriteria demikian (Katzung, 1995). Penelitian untuk mendapatkan obat anti kanker antara lain dilakukan dengan menggali senyawa-senyawa alam yang berasal dari tumbuh-tumbuhan, khususnya yang selama ini telah dipercaya oleh sebagian masyarakat sebagai obat tradisional penyakit kanker (Mangan, 2003).

Salah satu tanaman yang berpotensi diteliti pada pengobatan kanker adalah tumbuhan srikaya (*Annona squamosa* L.). Penelitian menunjukan ekstrak kloroform daun *A. squamosa* bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* sebesar

98 % dengan nilai *Lethal Concentration* 50 (LC_{50}) 1,77 μ g/mL. Ekstrak diklorometan dan ekstrak air biji *A. squamosa* menginduksi apoptosis pada sel tumor BC-8 (Pardhasaradhi *et al.*, 2004), sel kanker payudara (MCF-7) dan sel leukemia (K-562) (Pardhasaradhi *et al.*, 2005). Ekstrak etanol 70 % daun *A. squamosa* memiliki efek toksik terhadap sel HeLa dengan LC_{50} 7,6948 μ g/mL (Djajanegara dan Wahyudi, 2009). Golongan asetogenin yang diisolasi dari ekstrak etanol 95% biji srikaya, squamostanin-A dan squamostanin-B memiliki efek sitotoksik terhadap sel PC-3 dengan IC_{50} 7,33 x 10⁻⁴ μ g/mL (Yang *et al.*, 2009).

Fraksinasi ekstrak etanol daun srikaya dengan tujuan penyederhanaan komponen yang terkandung pada ekstrak etanol daun srikaya perlu dilakukan. Berdasarkan penelitian terdahulu, ekstrak air biji *A. squamosa* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker BC-8. Fraksi polar dari ekstrak etanol daun srikaya diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker yang lain (T47D).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti merumuskan masalah :

1. Apakah fraksi polar daun srikaya (*Annona squamosa* L.) mempunyai efek sitotoksik terhadap sel T47D dan berapa IC_{50} nya?
2. Golongan senyawa apa yang tersari dalam fraksi polar ekstrak etanol 96% daun srikaya?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui:

1. Efek sitotoksik fraksi polar daun srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap sel T47D dengan menggunakan metode MTT dan menghitung IC_{50} nya.
2. Golongan senyawa yang tersari dalam fraksi polar ekstrak etanol 96% daun srikaya (*Annona squamosa* L.) dengan metode uji tabung dan Kromatografi Lapis Tipis.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman srikaya (*Annona squamosa* L.)

a. Klasifikasi Tanaman

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Annonaceae
Marga	: <i>Annona</i>
Jenis	: <i>Annona squamosa</i> Linn.

b. Morfologi tanaman srikaya

Pohon atau perdu, tinggi 2-7 m. Daun eliptis memanjang sampai bentuk lanset tumpul, 6-17 kali 2,5-7,5 cm, tepi rata. Bunga 1-2 berhadapan atau disamping daun. Daun kelopak segitiga, waktu kuncup bersambung secara katup, kecil. Daun mahkota yang terluar berdaging tebal, panjang 2-2,5 cm, dari putih kuning, dengan pangkal yang berongga akhirnya ungu. Benang sari banyak, putih. Penghubung ruang sari di atas ruang diperpanjang dan melebar, dan menutup ruangnya. Bakal buah banyak, ungu tua. Kepala putik duduk, rekat menjadi satu, mudah rontok. Buah majemuk 1k bentuk bola, garis tengah 5-10 cm, berlilin. Anak buah khususnya dengan ujung yang melengkung, pada waktu masak sedikit atau banyak melepaskan diri satu dengan yang lain. Biji masak hitam mengkilat. Daging buah putih. Pohon buah-buahan dari Hindia Barat, banyak ditanam. *Srikaya*, j, Ind, S, *Sarkaja*, Md (Steenis, 2005).

c. Kandungan kimia

Tumbuhan *A. squamosa* mengandung beberapa senyawa aktif, antara lain flavonoid, borneol, kamphor, alkaloid, terpen, saponin, tanin, polifenol dan senyawa poliketida (Dalimarta, 2003). Daun dan kayu tumbuhan ini merupakan sumber yang kaya akan alkaloid aporfin. Hampir semua alkaloid yang dihasilkan oleh *A. squamosa* mempunyai struktur isokuinolin, seperti bensiltetrahidroisokuinolin, aporfin, dan oksoaporfin (Achmad, 2007).

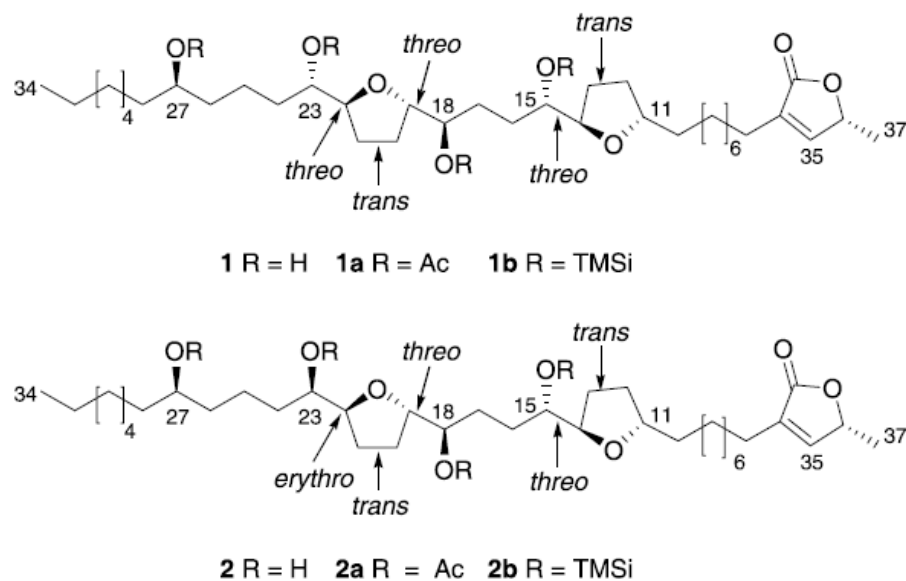
d. Kegunaan

Daun tumbuhan ini digunakan untuk mengatasi encok, batuk, salesma, demam, rematik, gangguan saluran pencernaan seperti diare, disentri, dan penyakit kulit, seperti borok, luka, bisul, kudis, enzema, antitumor, dan menurunkan kadar asam urat yang tinggi dalam darah (Achmad, 2007).

e. Penelitian terkait tentang potensi srikaya

Secara empiris tumbuhan *A. squamosa* telah digunakan luas untuk penyembuhan beberapa penyakit. Penelitian-penelitian mengenai potensi srikaya terus dilakukan untuk mengetahui potensi lain dari tumbuhan *A. squamosa*. Uji in vitro menunjukkan daun *A. squamosa* memiliki aktivitas antibakteri (Padhi, 2010). Dekok daun *A. squamosa* berpotensi sebagai larvasida terhadap larva *Aedes sp* (Maharantau, 2006). Ekstrak buah memperlihatkan aktivitas penghambatan yang signifikan terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dan *S. pneumonia* ATCC 46619 (Au *et al.*, 2003). Ekstrak pada streptozotocin (STZ) menginduksi diabetes mellitus dengan efek antihiperglikemi (Kaleem *et al.*, 2008).

Penelitian mengenai aktivitas sitotoksik tumbuhan *A. squamosa* menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik tanaman tersebut terhadap beberapa sel kanker. Ekstrak etanol 70 % daun *A. squamosa* memiliki efek toksik terhadap sel HeLa dengan LC_{50} 7,6948 μ g/mL (Djajanegara dan Wahyudi, 2009). Ekstrak diklorometan dan ekstrak air biji *A. squamosa* menginduksi apoptosis pada sel tumor BC-8 (Pardhasaradhi *et al.*, 2004), sel kanker payudara (MCF-7) dan sel leukemia (K-562) (Pardhasaradhi *et al.*, 2005). Isolat asetogenin dari ekstrak etanol 95% biji srikaya, squamostanin-A dan squamostanin-B (Gambar 1) memiliki efek sitotoksik terhadap sel PC-3 dengan IC_{50} 7,33 x 10⁻⁴ μ g/ml (Yang *et al.*, 2009).



Gambar 1. Struktur Squamostanin-A dan Squamostanin-B.

2. Kanker payudara

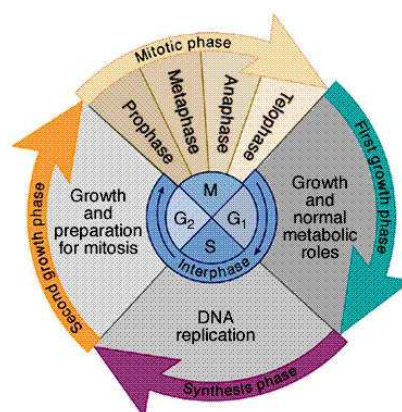
Kanker payudara adalah tumor ganas yang menyerang jaringan payudara. Jaringan payudara tersebut terdiri dari kelenjar susu (pembuat air susu), saluran kelenjar (saluran air susu), dan jaringan penunjang payudara (Mardiana, 2004). Setiap wanita usia lebih dari 40 tahun dikategorikan pada golongan resiko terhadap karsinoma payudara. Resiko semakin meningkat pada keadaan: (1) orang tua (ibu) pernah menderita kanker payudara terutama pada usia relatif muda, (2) anggota keluarga, kakak atau adik menderita karsinoma payudara, (3) sebelumnya pernah menderita karsinoma pada salah satu payudara, (4) penderita tumor jinak payudara, (5) kehamilan pertama terjadi sesudah umur 35 tahun (Tambunan, 1993).

Awal dari proses kanker payudara adalah ada peningkatan jumlah sel epitel di sepanjang garis duktus yang disebut hiperplasia. Ketika sel-sel epitel melakukan replikasi dan pembelahan diri, sel-sel tersebut mulai terlihat tidak normal dan disebut hiperplasia atipikal. Ketika sel tersebut menyerupai sel kanker payudara tapi masih berada dalam dinding duktus, ini disebut karsinoma duktus *in*

situ. Jika sel-sel tersebut keluar dari dinding duktus dan mulai menginvasi jaringan sekitarnya, ini disebut karsinoma duktus infiltrasi (Tagliaferri, 2007).

3. Siklus sel

Pemahaman mengenai sitostatik dan dasar pemakaiannya memerlukan pengertian akan siklus sel yaitu rangkaian kejadian yang terjadi pada pembelahan sel atau mitosis (Gambar 2).



Gambar 2. Siklus sel

Sesudah suatu sel bermitosis (fase M), ia masuk ke dalam fase G₁ (*Gap-1*). Dalam fase G₁ inilah, sel tersebut aktif membentuk RNA dan protein. Setelah melampaui fase G₁ barulah sel tersebut masuk ke dalam fase S (*Synthesis*) di mana sel tersebut dibentuk DNA mencapai 2 kali lipat. Barulah kemudian sel ini masuk dalam fase dalam fase G₂ (*Gap-2*). Selama fase G₂ sel tersebut aktif lagi membentuk RNA dan protein. Setelah melampaui fase G₂ barulah sel tersebut dapat membelah menjadi dua (Reksodiputro *et al.*, 2004).

4. Mekanisme obat antikanker pada siklus sel

Obat-obat antikanker yang berkaitan dengan siklus sel dibagi menjadi 2 macam, yaitu:

a. Nonspesifik terhadap fase sel

- 1) Obat spesifik siklus-nonspesifik fase hanya dapat efektif bekerja, bila sel-sel berada pada keadaan siklus generasi, tetapi obat-obatan tersebut dapat

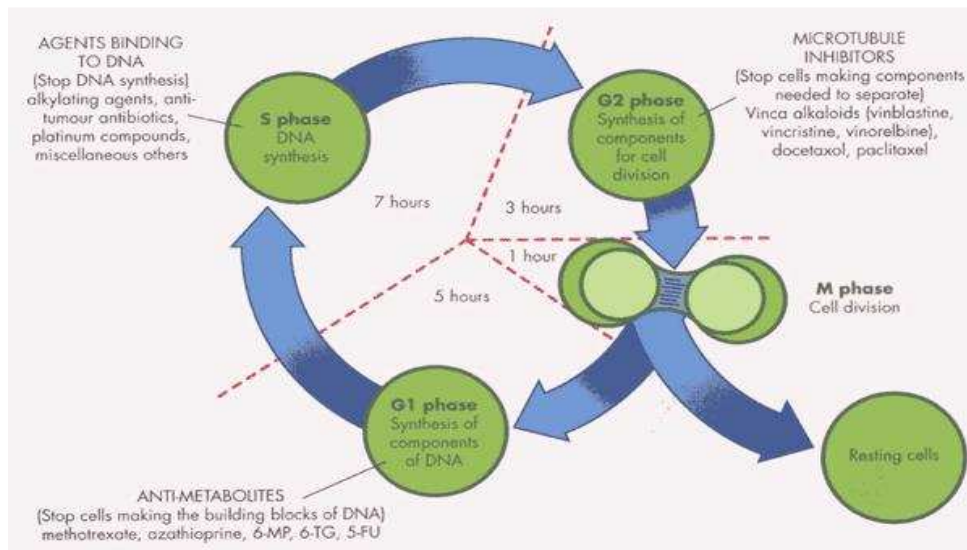
menyebabkan kerusakan sel pada setiap tahapan dalam siklus tersebut (misalnya obat alkilasi dan dekarbasi).

2) Obat nonspesifik siklus

Obat nonspesifik siklus, membunuh sel yang sedang tidak membelah diri (misalnya hormon steroid dan antibiotik tumor kecuali bleomisin).

b. Spesifik terhadap fase sel

- 1) Pada fase G-0 (*gap zero* atau fase istirahat) sebuah sel akan berada dalam keadaan tidak tumbuh dan pada fase ini sel tersebut menjalankan suatu fungsi khusus tertentu sesuai programnya. Pada fase ini hampir semua sel akan refrakter terhadap kemoterapi.
- 2) Fase G-1 (*gap 1* atau *interphase*) ialah suatu masa fungsional ketika sebuah sel bersiap memasuki fase S. Di sini RNA dan berbagai protein disintesis untuk memenuhi kebutuhan bagi fungsi tertentu sel. Di akhir tahap ini terjadi suatu ledakan produksi RNA dan di sini pula terjadi pembentukan enzim-enzim yang dibutuhkan bagi sintesis DNA. Contoh obat spesifik untuk fase ini L-asparaginase.
- 3) Pada fase S (Sintesis DNA) seluruh isi DNA inti sel mengalami penggandaan secara lengkap dan rinci, termasuk seluruh struktur kompleks kromosom, dan siap untuk pembelahan pada peristiwa mitosis. Contoh obat yang efektif untuk fase ini adalah obat antimetabolit, hidroksiurea, prokarbasi, dan heksametilmelanin.
- 4) Dalam fase G-2 (*gap 2*) sintesis DNA berhenti, sedangkan sintesis RNA dan protein berjalan terus, dan prekursor mikrotubular *spindle* mitotik terbentuk. Obat spesifik untuk fase ini adalah bleomisin dan alkaloid tanaman.
- 5) Dalam fase M (mitosis) sintesis RNA dan protein secara mendadak berhenti dan bahan-bahan genetik terbagi ke sel turunan. Setelah proses mitosis berakhir, sel baru masuk ke fase G-0 atau G-1. Contoh obat pada fase ini adalah alkaloid tanaman (Reksodiputro *et al.*, 2004). Mekanisme obat antikanker pada siklus sel dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Mekanisme obat antikanker

Beberapa kemoterapi yang digunakan untuk kanker payudara:

- 1) Tamoksifen, yang mekanismenya dengan berikatan pada reseptor modulator estrogen secara selektif.
- 2) Letrozole, anastrozole, dan exemestane, dengan mekanismenya sebagai aromatase inhibitors (menghambat kerja enzim aromatase untuk sintesis estradiol yang merupakan karsinogen).
- 3) Doxorubicin (golongan antrasiklin) dan trastuzumab, dengan mekanismenya kerja melisis sel-sel pembawa protein HER-2 (Dipiro, 2005).

5. Sel T47D

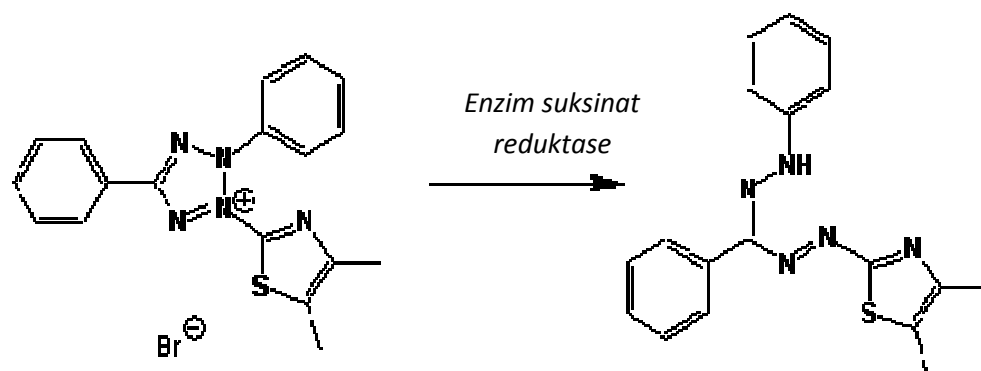
Sel T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continuous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen *stock* jika terjadi kontaminasi. Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel (Anonim, 2005). Sel T47D telah dilaporkan memiliki reseptor hormon steroid pada estrogen, progesteron, glukokortikoid, androgen (Ono *et al.*, 1987), 17 beta estradiol dan calcitonin (Anonim, 2005).

Sel kanker payudara mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Missense mutation* terjadi pada residu 194 (zinc-binding domain, L2). p53 tidak

dapat mengikat unsur-unsur DNA sehingga dapat mengurangi atau menghapuskan kemampuannya untuk mengatur siklus sel. Selain itu, sel T47D merupakan estrogen/progesterone-positif (Schafer *et al.*, 2000).

6. Uji sitotoksik dengan *MTT assay*

MTT assay merupakan metode pengukuran secara kolorimetri. Metode *MTT assay* dipilih dengan alasan cara pengerjaannya yang relatif aman, cepat, reabilitas tinggi (akurat), lebih mudah jika dibandingkan dengan perhitungan langsung serta hasilnya dapat digunakan untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan. Reagen *MTT* merupakan garam tetrazolium yang larut dalam air dan menghasilkan larutan berwarna kuning. Garam tetrazolium dapat dipecah menjadi formazan oleh sistem reduktase suksinat yang terdapat pada jalur respirasi sel pada mitokondria sel hidup (Gambar 4). Enzim mitokondria pada sel aktif tersebut yang memetabolisme garam tetrazolium sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan (Doyle dan Griffiths, 2000 *cit* Suhartatik, 2008).



Gambar 4. Reaksi reduksi MTT menjadi Formazan

Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel tumor secara *in vitro* dan jika toksisitas ini ditransfer menembus sel tumor *in vivo* senyawa tersebut mempunyai aktivitas antitumor (Evans, 2002). Akhir uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat maksimal yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksitas pada

organ target memberikan informasi tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle dan Griffiths, 2000 *cit* Suhartatik, 2008).

E. Landasan Teori

Penelitian mengenai aktivitas sitotoksik dari bagian tumbuhan srikaya telah dilakukan. Berdasarkan uji toksisitas daun srikaya (*Annona squamosa* L.), menggunakan uji kematian anak udang (larva *Artemia salina* Leach) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menunjukan ekstrak kloroform daun *A. squamosa* pada dosis 10µg/mL menunjukan efek toksik dengan nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) 1,77µg/mL. Ekstrak etanol 70 % daun *A. squamosa* memiliki efek toksik terhadap sel HeLa dengan nilai LC₅₀ sebesar 7,6948µg/mL (Djajanegara dan Wahyudi, 2009). Ekstrak air biji *A. squamosa* menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker payudara dan sel kanker leukemia (Pardhasaradhi *et al.*, 2005). Senyawa asetogenin yang diisolasi dari tumbuhan *A. squamosa* memiliki aktivitas biologi yang poten, antara lain sebagai sitostatik, pestisida, antimalaria, menghambat pertumbuhan sel, antiparasit dan antimikrobia.

Tumbuhan *A. squamosa* mengandung beberapa senyawa aktif, antara lain flavonoid, borneol, kamphor, alkaloid, terpen, saponin, tanin, polifenol dan senyawa poliketida (Dalimarta, 2003). Daun dan kayu *A. squamosa* mengandung sumber yang kaya akan alkaloid aporfin yang memiliki struktur isokuinolin (Achmad, 2005).

F. Hipotesis

Frakasi polar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona squamosa* L.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D dengan golongan senyawa yang terkandung alkaloid, flavonoid dan polifenol.